

三七、绞股蓝抗兔血管重构的实验研究

文小平¹, 郑晓洁¹, 川崎宽也², 丹保岳人², 野中雅彦², 陈德兴^{1*}
(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 日本味之素株式会社, 日本 东京)

[摘要] 目的: 研究三七、绞股蓝单方及配伍方对实验性兔动脉粥样硬化(AS)模型血管重构的影响。方法: 64 只 3~4 月龄新西兰雄兔随机分为正常组(Control)、模型组(Model)、三七组(SQ)、绞股蓝组(JGL)、复方组(FF)、卡托普利组(Captopril)。除正常对照组外, 均予耳缘静脉注射牛血清白蛋白 250 mg/kg 后继喂高脂饲料, 同时各药物组给予相应的药物, 连续 12 周。于 12 周末行胸主动脉 HE、EF(弹力纤维)染色, 观测 VSMC(血管平滑肌细胞)核个数、EF 的变化; 免疫组织化学标记胸主动脉 PCNA(增殖细胞核抗原)、TGF- β 1(转化生长因子- β 1)表达。结果: (1) 与模型组比较, 各药物组主动脉病变不同程度减轻, 尤以复方组为优; (2) 复方组与模型组比较 VSMC 核个数显著下降; (3) 模型组与正常组比较, 主动脉 PCNA 数密度百分数、TGF- β 1 面积百分比显著升高($P < 0.01$), 各药物组有不同程度的降低。结论: 三七、绞股蓝及复方通过降低 TGF- β 1 表达, 减轻该因子致细胞增殖的作用, 减轻血管壁肥厚性重构。

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管重构; 三七; 绞股蓝

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)08-0024-05

Effect of *Panax notoginseng* (San Qi) and *Gynostemma pentaphyllum* (Jiao Gu Lan) on Vascular Remodeling in Rabbits

WEN Xiao-Ping¹, ZHENG Xiao-jie¹, Hiroya Kawasaki², Takehito Tanbo², Masahiko Nonaka², CHEN De-xing^{1*}
(1. Shanghai Traditional Chinese Medical University, Shanghai 201203, China; 2. Japan Ajinomoto, Tokyo Japan)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of *Panax notoginseng* (SQ) and *Gynostemma*

pentaphyllum (JGL) on vascular remodeling. **Methods:** A total of sixty-four male New Zealand rabbits was randomly divided into six groups: Normal, Model, SQ, JGL, FF(SQ+ JGL) and Captopril. The rabbits in control group were fed with regular diet, others were injected with bovine serum albumin 250 mg/kg and fed with high cholesterol diet, meanwhile, drugs were administrated orally. Rabbits were sacrificed at the end of 12 week, aortas serial cross-sections were stained with hematoxylin-eosin and elastic fibers. Immunohistochemistry were performed to label PCNA and TGF- β 1. **Results:** (1) The pathological changes of all drug treated groups were alleviated. (2) Compound prescription decreased the quantity of aorta VSMC nucleus compared with model group ($P < 0.05$). (3) The aorta PCNA immunostaining number and TGF- β 1 immunostaining area of model group were significantly higher than normal group ($P < 0.01$), all drug treated groups decreased. **Conclusion:** Reduced expression of TGF- β 1, and cellular proliferation may be related with inhibition of VR.

[**Key words**] atherosclerosis; vascular remodeling; *Panax notoginseng*; *Gynostemma pentaphyllum*

动脉粥样硬化为临床常见病、多发病,可引起严重的心、脑、肾等并发症,血管重构既是动脉粥样硬化的重要病理变化,又是其维持、进展及各种并发症的结构基础。遗传、血流动力学、血管活性物质和神经体液等因素共同参与或介导。目前认为动脉粥样硬化血管重构的核心环节是生长因子对血管平滑肌细胞增殖的调控、内皮细胞损伤以及细胞外基质增生等。

中医针对动脉粥样硬化属痰浊、瘀血相互交结的病因病机,采用活血化瘀的三七,补虚、祛痰的绞股蓝配伍,在注射牛血清白蛋白继喂高脂饲料的方法复制家兔实验性动脉粥样硬化模型上,观察血管重构的病理变化及三七、绞股蓝对病变的预防作用,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 动物 (3~4) 月龄新西兰兔,雄性 64 只,体重 (1.70~2.34) kg,购自上海陈行实验用兔有限公司,合格证号:0007147。

1.2 药物及试剂 三七混悬液:每次称取三七粉 24 g,溶于 200 mL 蒸馏水,玻棒搅匀,制成含生药 0.12 g/mL 的混悬液。产地:云南;批号:050719;绞股蓝水煎液:每次称取药材 945 g,在 10 L 蒸馏水中浸泡 3 h,煎煮 90 min,取滤液,残渣加入 5 L 蒸馏水再次煎煮 60 mins,合并两次滤液,直火浓缩至 2 625 mL,制成含生药 0.36 g/mL 的水煎液。产地:河南,批号:040410-9。以上药材均由养和堂中药饮片有限公司提供。卡托普利片:12.5 mg/片(中美上海施贵宝制药有限公司提供)。牛血清白蛋白(北京舒伯伟化工仪器有限责任公司上海分公司),胆固醇(国药集团化学试剂有限公司),TGF- β 1 免疫组织化学试剂盒 SC-146,PCNA 免疫组织化学试剂盒(ZM-0213 武汉博

士德)。

1.3 仪器 FA1004 Sartorius 电子天平;OLYMPUS BX51 正置系统显微镜;MOTICAM-1300 数码摄影系统;HPIAS-1000 高清晰度病理图文分析软件。

2 方法

2.1 造模及给药方法 适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,即正常组 A、模型组 B、三七组 C、绞股蓝组 D、复方组(三七、绞股蓝按照 1:3 混合) E、卡托普利组 F。正常组给予普通兔饲料,其余 5 组耳缘静脉注射牛血清白蛋白 250 mg/kg,之后喂食高胆固醇饲料(1%胆固醇+99%基础饲料) 12 周^[1],同时各药物组灌胃给药。其中,三七组: $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (生药量);绞股蓝组: $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;复方组: $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;卡托普利组: $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;正常组:蒸馏水(与三七组同容积)。每日早八点给药 1 次,疗程 12 周。

2.2 主动脉组织病理学 血管平滑肌细胞(VSMC)核采用 HE 染色,弹力纤维(EF)采用间苯二酚复红染色。

2.3 主动脉增殖细胞核抗原(PCNA)与转化生长因子 β 1(TGF- β 1)表达 免疫组化 SP 法检测。

2.4 统计学方法 采用统计分析软件 SPSS 11.5 for windows 进行统计处理,多组均数比较用方差分析法。并进行有关的相关回归分析。

3 结果

3.1 肉眼观察主动脉组织病理学改变 正常组主动脉形态正常,内膜光滑且较薄,未见脂质沉积及斑块形成;模型组动脉内膜附有淡黄色斑块,边缘不整齐,部分区域延续成片,布满管腔,沿管腔呈环状分布;卡托普利组动脉内膜有淡黄色斑块形成,突向管腔,灶性分布;三七组、绞股蓝组、复方组动脉内膜有

淡黄色斑块形成,稍隆起,斑块呈不连续间断分布。

3.2 光镜观察(HE、EF染色) 正常组动脉壁3层结构完整,内皮细胞紧贴于内弹力板有序排列,管腔平滑,内膜内无泡沫细胞、淋巴细胞聚集,中层平滑肌呈梭形或椭圆形,分层排列,无增生现象,弹力纤维排列整齐,无断裂及溶解现象,动脉管壁柔软富有弹性;模型组动脉内膜显著增厚,内皮细胞脱落,管腔明显变窄而大小不规则,内膜中可见大量泡沫细

胞及淋巴细胞聚集,呈圆形、卵圆形或长形,有的极度膨大,呈气球样改变,并可见脂肪坏死中心,中膜平滑肌增生;弹力纤维断裂、溶解;西药组动脉内膜部分区域增厚,平滑肌增生较模型组略轻;中药组动脉内膜部分区域增厚,内有数量不等泡沫细胞沉积,部分区域内皮细胞脱落,结构尚完整,动脉壁各界较清晰,平滑肌轻度增生,弹力纤维排列比较整齐。尤以复方组为优。结果见图1~2。

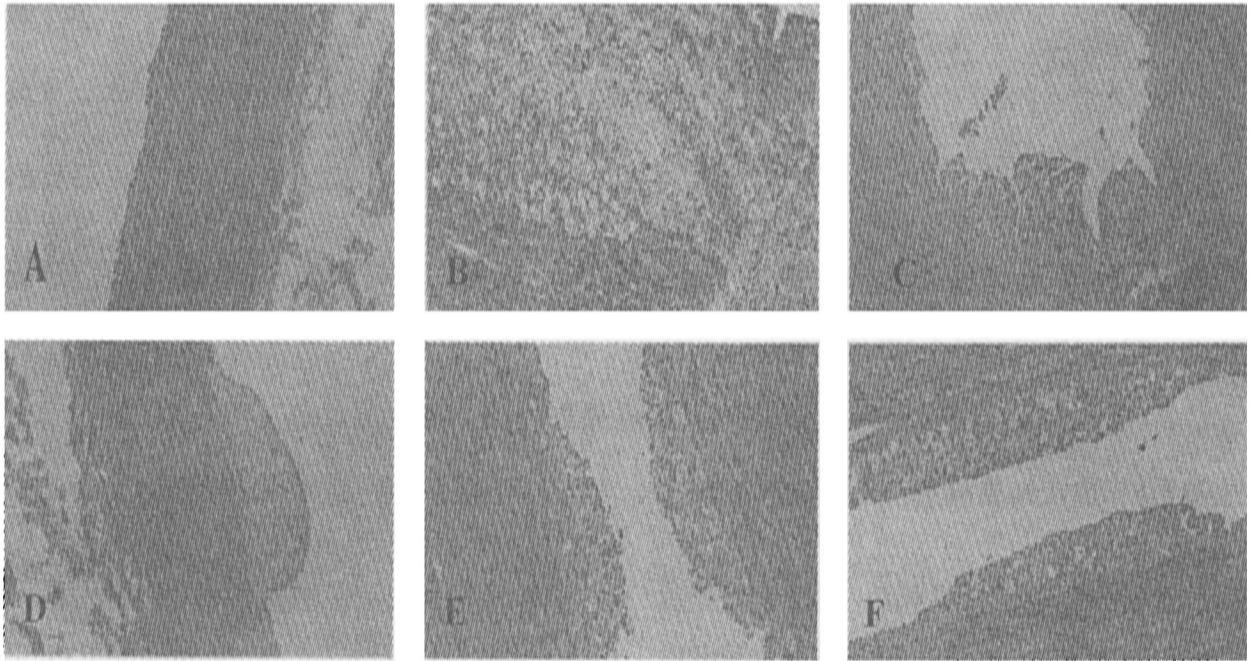


图1 胸主动脉 HE 染色(×200)

A.正常组;B.模型组;C.三七组;D.绞股蓝组;E.复方组;F.卡托普利组

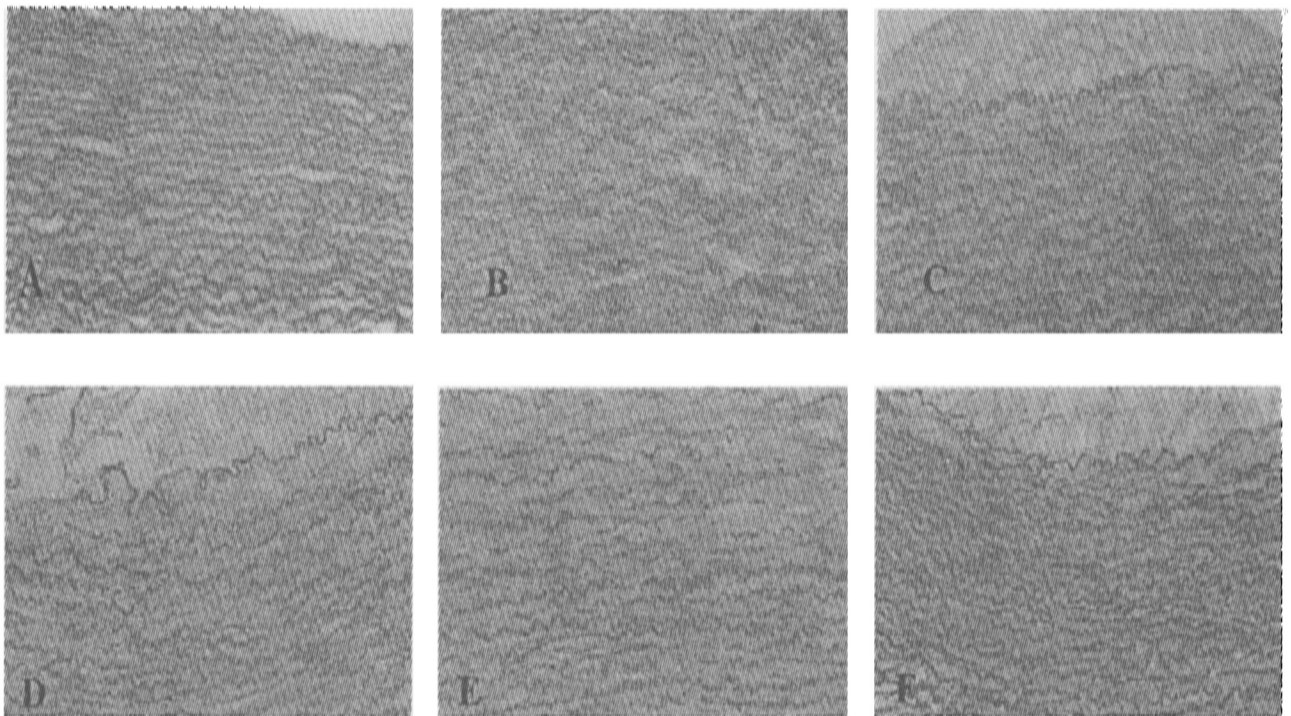


图2 胸主动脉弹力纤维染色(×400)

A.正常组;B.模型组;C.三七组;D.绞股蓝组;E.复方组;F.卡托普利组

3.3 主动脉 VSMC 核数密度百分数 见表 1。复方组与模型组比较显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 VSMC 核数密度百分数 ($\bar{x} \pm s$)

Group	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	VSMC 核数密度 (%)
Control	—	$0.224 6 \pm 0.029 7^{2)}$
Model	—	$0.278 4 \pm 0.019 9$
SQ	0.3	$0.227 7 \pm 0.043 5$
JGL	0.9	$0.256 6 \pm 0.065 2$
FF	1.2	$0.231 5 \pm 0.031 4^{1)}$
Captopril	0.125	$0.258 4 \pm 0.041 7$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 胸主动脉 PCNA、TGF- β 1 表达 见图 3~4,表 2~3。与正常组比较,模型组主动脉 PCNA 数密度百分数、TGF- β 1 面积百分比等均显著增加 ($P < 0.01$),各药物组有不同程度的降低。

4 讨论

中医学认为 AS 属痰浊、瘀血相互交结。三七味甘、微苦,性温功可活血化瘀;绞股蓝味苦、微甘,性凉,功可补气祛痰,二者配伍,可以活血消痰。

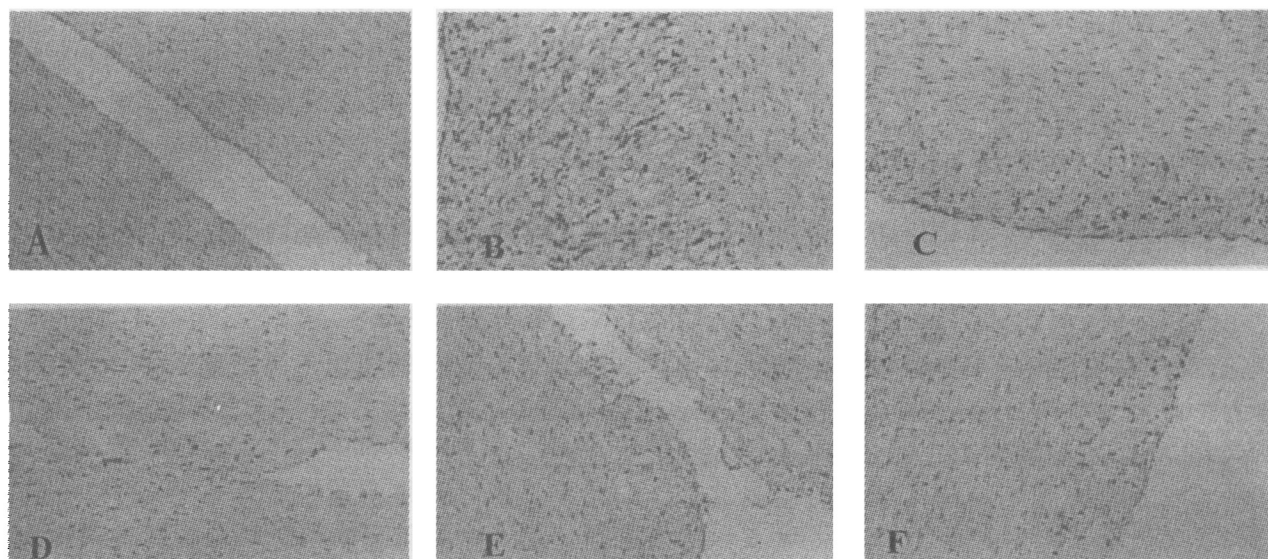


图 3 胸主动脉 PCNA 表达 ($\times 200$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 三七组; D. 绞股蓝组; E. 复方组; F. 卡托普利组

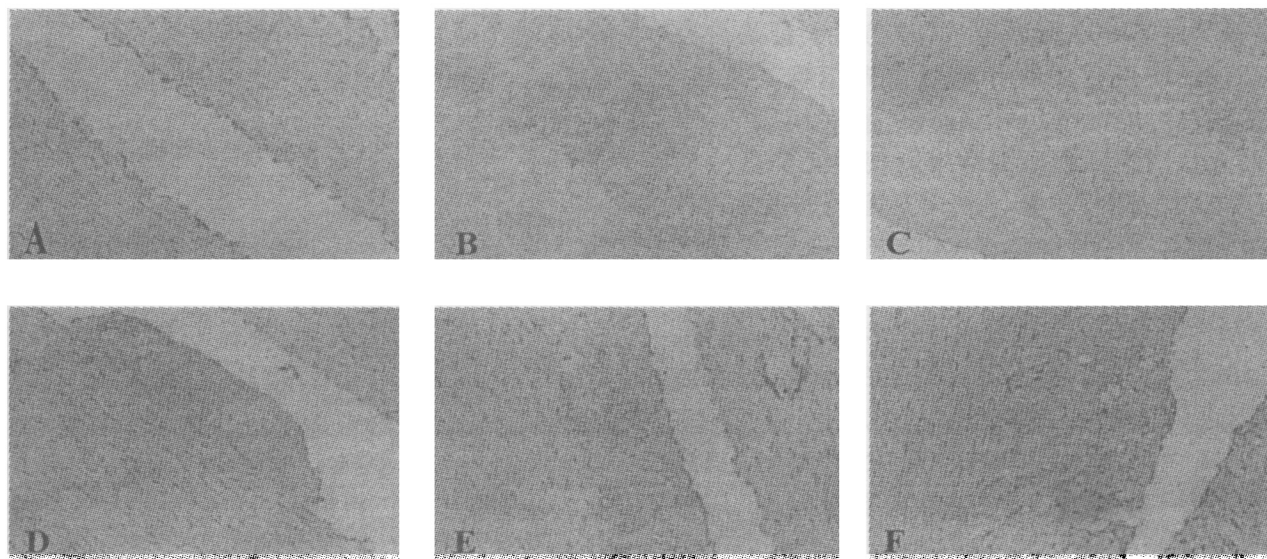


图 4 胸主动脉 TGF- β 1 表达 ($\times 200$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 三七组; D. 绞股蓝组; E. 复方组; F. 卡托普利组

表 2 PCNA 数、面、光密度(场面积 44 877.92 μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

Group	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	数密度百分数(%)	面密度百分数(%)	平均光密度总和	积分光密度总和
Control	—	0.02 \pm 0.02 ⁴⁾	0.09 \pm 0.16 ⁴⁾	1.84 \pm 2.62 ⁴⁾	9.57 \pm 17.10 ⁴⁾
Model	—	0.28 \pm 0.14 ²⁾	3.18 \pm 1.77 ²⁾	56.20 \pm 32.53 ²⁾	690.58 \pm 431.38 ²⁾
SQ	0.3	0.13 \pm 0.07 ^{2,4)}	1.16 \pm 0.76 ^{2,4)}	17.71 \pm 9.13 ^{2,4)}	163.67 \pm 110.25 ^{2,4)}
JGL	0.9	0.09 \pm 0.09 ⁴⁾	1.15 \pm 1.78 ³⁾	14.79 \pm 17.37 ⁴⁾	221.68 \pm 377.87 ³⁾
FF	1.2	0.10 \pm 0.08 ^{2,4)}	1.02 \pm 1.00 ^{1,4)}	16.87 \pm 16.67 ^{1,4)}	179.42 \pm 224.82 ⁴⁾
Captopril	0.125	0.08 \pm 0.05 ^{2,4)}	0.61 \pm 0.44 ^{2,4)}	11.95 \pm 8.15 ^{2,4)}	92.14 \pm 73.51 ^{2,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 TGF- β 1 面积百分比变化及中药对其影响
(场面积 2 900 099 μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

Group	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	面积百分比
Control	—	0.04 \pm 0.05 ²⁾
Model	—	11.46 \pm 4.35 ¹⁾
SQ	0.3	6.63 \pm 4.50 ¹⁾
JGL	0.9	3.54 \pm 1.47 ^{1,2)}
FF	1.2	2.01 \pm 0.82 ^{1,2)}
Captopril	0.125	3.02 \pm 1.93 ^{1,2)}

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

AS 的血管重构(VR),既是 AS 的重要病理变化,又是 AS 维持、进展的结构基础。VR 最早由 Baumbach^[2] 等人于 1989 年提出,现常用来泛指血管各种类型结构和功能的改变。有狭义和广义之分:狭义^[3]是指原有 VSMC 的重新排列,VSMC 的分层增多,又称为非肥厚性重构;广义的 VR 指伴有明显的中膜 VSMC 的增生和肥大,导致 VSMC 的数量和容积的增多,同时伴有细胞间纤维性和非纤维性基质不同成分的沉积,故又称为肥厚性重构。

VR 中心环节是细胞的增殖、迁移、凋亡以及基质^[4] 成分的合成、降解及重新排列等过程。当 EC 受损时,多种因子如 TGF- β 1、Ang II、 $\text{I}\alpha$ -FGF、PDGF-BB 等充当了 VSMC 的趋化因子,使其从收缩型转化为合成型,移行至内膜并迅速增殖,同时产生大量的胶原纤维、弹力纤维、蛋白多糖和糖蛋白等细胞外基质,平滑肌细胞也可能变成巨噬细胞,并吞噬胆固醇,形成肌原性泡沫细胞。本研究结果发现,HE 染色中模型组内膜斑块、VSMC 核数密度均显著大于正常组和药物预防组,复方组 VSMC 数密度与模型组比较有非常显著性差异,斑块面积也最小。证实在 AS 时,VSMC 转活为合成表型,自身发生肥大、增殖和迁移。三七、绞股蓝能不同程度的预防斑块的形成,内膜增厚及平滑肌细胞增殖、迁移。尤以复方组疗效最好。

AS 病变中 TGF- β 1 主要来源是激活的巨噬细胞及 T 细胞,亦可由血小板产生,具有诱导增殖、迁移的作用。本研究免疫组化结果发现,模型组 TGF- β 1 在内膜斑块处呈强阳性,而 VSMC 数密度最高,推测在 AS 时,高密度 VSMC 表达高亲和力 TGF- β 1 受体 II、III 型,TGF- β 1 通过高亲和力受体刺激 DNA 合成,

诱导增殖。药物预防各组 TGF- β 1 在内膜斑块处呈弱阳性,除绞股蓝组外,面密度与模型组比较显著降低,差异有非常显著性意义。尤以复方组疗效最好。

PCNA 又称周期蛋白、周期素,是一种仅在增殖细胞中合成或表达的核内多肽,可以作为评价细胞增殖状态的指标^[5]。PCNA 的量可以客观的反映 SMC 增殖的数量及分布。本研究免疫组化结果发现,模型组 PCNA 数密度、面密度、平均光密度、积分光密度等均显著高于正常组及各药物组,说明模型组平滑肌细胞处于增殖旺盛,与 VSMC 核密度及组织形态学的指标相一致。

TGF- β 1 是细胞外基质形成的激活物,可诱导胶原产生及抑制基质成分的蛋白水解性降解,刺激 ECM 合成和沉积作用,可以在转录、转录后及翻译水平增加胶原等间质蛋白质的合成,同时可通过抑制胶原酶等金属蛋白酶的分泌及刺激金属蛋白酶抑制剂的表达而抑制胶原的降解,从而在组织纤维化形成过程中起作用。

总之,三七、绞股蓝及两者配伍通过降低 TGF- β 1 表达,减轻该因子致细胞增殖的作用,抑制血管壁肥厚性重构,以两者的配伍疗效最佳。

[参考文献]

- [1] 朱明军,曾垂义,王振涛. 调脂胶囊对动脉粥样硬化家兔胸主动脉组织形态学的影响[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(6): 346-347.
- [2] Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension[J]. Hypertension, 1989, 13: 968.
- [3] Dunn WR, Wallis SJ, Gardiner SM. Remodeling and enhanced myogenic tone in cerebral resistance arteries isolated from genetically hypertensive Brattleboro rats[J]. J Vase Res, 1998, 35: 18.
- [4] Faries PL, Rohan DI, Wyers MC, et al. Vascular smooth muscle cells derives from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration, and proliferation than venous cells[J]. J Surg Res, 2002, 104: 22.
- [5] Rodrgo B, Rainer F, Patricia AB, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ [J]. Natrue, 1987, 326: 515.